

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-141899

(43)Date of publication of application : 24.05.1994

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C12N 15/00  
C12N 15/10  
C12Q 1/04  
// (C12Q 1/04  
C12R 1:225 )

(21)Application number : 04-317920

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 04.11.1992

(72)Inventor : TSUCHIYA YOICHI  
KANO YUKINOBU

## (54) METHOD FOR HIGHLY SENSITIVELY DETECTING LACTOBACILLUS

### (57)Abstract:

PURPOSE: To rapidly and highly sensitively detect the lactobacilli by extracting the DNA of the lactobacilli from a specimen containing the lactobacilli, coprecipitating tRNA, recovering the DNA, and

subsequently subjecting the DNA to a PCR using a specific primer.

CONSTITUTION: A specimen containing lactobacilli is filtered with a polycarbonate membrane filter, and the filter is subjected to an ultrasonic treatment in a volatile solvent, which is then evaporated.

The obtained specimen is treated with lysozyme, mutanolysin, proteinase K and SDS, and the DNA of the lactobacilli is extracted.

The extract is treated with ethanol to coprecipitate tRNA, and the DNA of the lactobacilli is recovered. The recovered DNA is subjected

to a PCR using an oligomer having a sequence of formula I or II originated from the gene of rRNA or having a sequence complementary

with the sequence of formula I or II to amplify a sequence specific to the lactobacilli bacteria, and the presence of the lactic acid is

subsequently judged.

5'-TGTCGTGGCGA TAGGCTGAA-3'

5'-CGGTGCGAAGCTTCCTATCCT-3'

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.09.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 07.10.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-141899

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A	A 7823-4B		
C 1 2 N 15/00		A 8931-4B		
15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/04				

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-317920

(22)出願日 平成4年(1992)11月4日

(71)出願人 000002196

サッポロビール株式会社

東京都中央区銀座7丁目10番1号

(72)発明者 土屋 陽一

静岡県焼津市岡当目10番地 サッポロビ  
ル株式会社醸造技術研究所内

(72)発明者 狩野 幸信

静岡県焼津市岡当目10番地 サッポロビ  
ル株式会社醸造技術研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 乳酸菌の高感度検出法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 乳酸菌を含む検体より、乳酸菌のDNAを抽出し、この抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する。このDNAに対して下記の配列群の少なくとも1つを有するか又は該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

5' - T G T G G T G G C G A T A G C C T G A A -  
3'

5' - G C G T G G C A A C G T C C T A T C C T -  
3'

【効果】 ビールなどの食品に含まれる乳酸菌を非常に高感度、かつ短時間に検出することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法。

(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて濾過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによ

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' ..... (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' ..... (b)

【請求項2】 揮発性溶液が、エタノールである請求項1記載の方法。

【請求項3】 プライマーが、請求項1記載の各オリゴヌクレオチドの配列のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチドである請求項1記載の方法。

【請求項4】 PCRを行う際に、Pfu Polymeraseを使用する請求項1記載の方法。

【請求項5】 乳酸菌の検出を、ポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動および臭化エチジウムによる核酸染色により行う請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳酸菌の迅速かつ高感度な検出法に関し、詳しくは食品、特にビールの品質に悪影響を及ぼす*Lactobacillus brevis*をはじめとする乳酸菌の検出法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】 食品、特にビール製造において、乳酸菌はその耐酸性と耐アルコール性から最も重要な有害菌である。そのため、ビールなどの食品中から該乳酸菌を迅速かつ高感度に検出する方法の開発が待望されている。かかる要望に応えるべく我々は研究を重ね、既に特願平3-191114号にお

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' ..... (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' ..... (b)

【0004】 検体中の極少数の微生物の検出をPCRを用いて行うことを考えた場合、まず初めに検体の容量

(通常は数百ml)をいかに効率よく減らしてPCRにかけられるような数十 $\mu$ lという容量にするかということが問題となる。そこで、本発明においては、まずポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて検体を濾過し乳酸菌を捕獲する。ここで、フィルターの材質であるポリカーボネートとしては特に制限はないが、ビスフェノール系のものが好ましい。フィルターは、膜厚が100 $\mu$ 以下、孔径が1 $\mu$ 以下、特に0.6 $\mu$ 以下のものが好適である。従来は、主に親水性ポリフッ化ビニリデン系メンブランフィルターが使用されていたが、乳酸菌の回収率が十分とは言えなかった。ポリカーボネート製メン

って乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、

(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

いて、250mlのビール中にわずか30菌体の*L. brevis*を検出することが可能な方法を開示した。しかし、乳酸菌はわずか1菌体でも製品ビール中に混入すれば、やがて増殖して混濁を起こす可能性があることを考えれば、さらに高感度な乳酸菌の検出法が望まれる。そこで、本発明の目的は、前述の方法を上回る感度の乳酸菌の検出法を提供することにある。

## 【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明は、下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法に関する。(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて濾過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによって乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

ブランフィルターを用いることにより、乳酸菌の回収率を向上させることができる。

【0005】 次に、濾過に用いたフィルターを揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させる。ここで、揮発性溶液は乳酸菌のDNAに損傷を与えないようなものであればよく、アルコール系、フェノール系などのヒドロキシル基含有化合物が好適であり、特にエタノールが好ましい。揮発性溶液中で超音波処理を行い菌体をフィルターより遊離させた後、エタノール等の揮発性溶液を蒸発させることにより検体の容量を短時間で減少させる。

【0006】 次に、lysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSを用いることによって検体中より乳酸

菌のDNAを効率よく抽出する。エタノール沈澱処理によって乳酸菌のDNAを回収する際に、tRNAを共沈物として用いることによって回収率を高めることができる。

【0007】さらに、PCRの効率を上げる手段として、ゲノム当たり複数個存在することが知られているrR

5' - TGTGGTGCGATAGCCTGAA - 3' ..... (a)

5' - GCGTGGCAACGTCCTATCCT - 3' ..... (b)

【0008】なお、本発明ではPCRを行う際に、Taq Polymeraseよりも耐熱性と正確さに優れているPfu Polymeraseを使用することによって、一層効率よくPCRを行うことができる。PCRを行って乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

【0009】乳酸菌の検出は、種々の方法により実施することができるが、本発明では例えば上記の酵素反応液をポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動にかけることにより行い、増幅されたヌクレオチド断片の存在とその長さを確認することができる。その結果から、検体中にプライマーが認識すべきヌクレオチドが存在しているか否かを判定できる。判定は、臭化エチジウムによる核酸染色により行う。この判定により、乳酸菌の有無を判定するのである。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、他の電気泳動やクロマトグラフィーも有効である。

【0010】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

#### 実施例1

##### PCR用サンプルの調製

250mlのビールに様々な数の *L. brevis* JCM1059<sup>T</sup> を添加（菌数はコロニーカウント法により測定）した検体を、ポリカーボネート製メンブレンフィルター（直径47mm、膜厚10μm、孔径0.4μm、Millipore社製、アイソポアメンブレン）で吸引濾過した後、該フィルターを10ml容のチューブに入れ、5mlのエタノールを添加する。超音波処理5分、振とう30分の後、フィルターを取り除き、チューブ内のエタノールを濃縮遠心機にて蒸発させた後、検体を100μlの滅菌水に溶かす。

【0011】次に、上記検体溶液に150μlの溶菌液A〔(1.67 M sucrose/0.8mg/ml lysozyme/16.8μg/ml mutanolysin) in 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)〕を添加し、37℃で30分処理した後、150μlの溶菌液B〔(13.3mM MgCl<sub>2</sub>/2.7% triton X-100/2.7% diethyl pyrocarbonate/0.27mg/ml proteinase K/6.7% SDS) in 10 mM potassiumphosphate buffer(pH 6.8)〕を添加し、70℃で10分処理して溶菌を行った。その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱処

理を行って核酸成分を精製した。なお、エタノール沈澱処理の際に共沈物として500ngのtRNAを用いた。この後、10μlの緩衝液（10mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM EDTA）に溶かし、これをPCR用サンプルとした。

##### 【0012】プライマーの合成

*L. brevis*の5S rRNA遺伝子の配列（Woese, C.R. et al., J. Mol. Evol. 8, 143-153 (1976)）から前記した配列(a), (b)を選び、それと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。なお、DNA合成および精製は宝酒造株式会社に委託した。

##### 【0013】PCR

PCR用サンプルに、終濃度500nMのプライマー(a)および(b)、200μMのdNTPs および10X Pfu Polymerase用反応液（TOYOBO社製）を加えて全量を99.5μlとした。これを94℃で5分、45℃で5分処理した後、75℃に温度を維持しつつ1.25UのPfu Polymerase（TOYOBO社製）を添加した。この後、直ちに以下の条件でPCRを行った。なお、温度制御はTAITEC社製、TR-100を用いて行った。

【0014】熱変性：94℃、30秒

アニーリング：45℃、5秒

重合反応：75℃、10秒

以上を1サイクルとして40サイクル実施

##### 【0015】検出

反応液から、増幅されたヌクレオチド断片を検出する方法として、縦型の5%ポリアクリルアミド電気泳動（Bio-Rad社製、Mini-PROTEAN II）を行った。PCR処理後の反応液から10μlを取り出し、泳動を行った。泳動は、TBE溶液（89mM Tris/89mM boric acid/2mM EDTA (pH 8.0)）を用い、300Vで6分を行った。その後、ゲルを臭化エチジウム溶液（0.5μg/ml）にて染色し、紫外線照射によって視覚化した。

##### 【0016】結果

図1に示したように、ビールに1菌体の *L. brevis* を添加した場合、試験した9点中3点が陽性（正解率33%）となった。その他の菌数の場合、表1のような結果となった。

##### 【0017】

【表1】

菌数 (cells )	陽性となった数／試験した数	正解率 (%)
1	3／9	33
3	7／12	58
5	8／12	66
8	5／6	83
9	6／6	100

【図面の簡単な説明】

【図1】 *L. brevis* 添加（菌数1個／ビール250ml）試験結果を示す電気泳動写真である。矢印は、PCRによって増幅されたバンドを示し、このバンドが観察されるものを陽性（+）、観察されないものを陰性（-）とした。MはDNAサイズマーカーである。

M

圖題代用写真

+ - = + - + - + - + -

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 1 2 R 1:225)

### 技術表示箇所

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-289295

(43)Date of publication of application : 07.11.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

```
// C12H 1/00
```

(C12N 15/09

C12R 1:225 )

(C12N 15/09

C12R 1:24 )

(C12N 15/09)

C12R 1:245 )

(C12N 15/09)

C12R 1:25 )

(21)Application number : 06-092448

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 28.04.1994

(72)Inventor : YASUI TETSUJI

**(54) DETECTION OF IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS**

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a novel 16Sr RNA gene of a lactobacillus which can promptly and steadily detect or identify lactobacillus of types being difficult in detection or identification and containing a part or the whole part of a specific base sequence, for example, the prompt detection of lactobacillus which deteriorates the quality of beer.

**CONSTITUTION:** A novel lactobacillus 16Sr RNA which contains a part or the whole part of the base sequence containing the base sequence of the formula, thus can promptly detect or identify the lactobacillus which cannot be detected or identified with the known primers for detecting lactobacilli and can judge the presence or absence of the lactobacillus hazardous to beer such as *Lactobacillus brevis* or *Lactobacillus casei* deteriorating beer qualities. This gene is obtained by selecting a strain which can proliferate in beer and is inert in the antigen-antibody reaction with anti-*Lactobacillus brevis* JCM 1170 serum from hetero-type fermentation lactobacilli separated from beer or beer factory and separating its 16S ribosome RNA according to an ordinary process.

GETTOWOOD LINDA TRACY	1944-1946	1946-1948	1948-1950	1950-1952	1952-1954	1954-1956	1956-1958	1958-1960	1960-1962	1962-1964	1964-1966	1966-1968	1968-1970	1970-1972	1972-1974	1974-1976	1976-1978	1978-1980	1980-1982	1982-1984	1984-1986	1986-1988	1988-1990	1990-1992	1992-1994	1994-1996	1996-1998	1998-2000	2000-2002	2002-2004	2004-2006	2006-2008	2008-2010	2010-2012	2012-2014	2014-2016	2016-2018	2018-2020	2020-2022	2022-2024	2024-2026	2026-2028	2028-2030	2030-2032	2032-2034	2034-2036	2036-2038	2038-2040	2040-2042	2042-2044	2044-2046	2046-2048	2048-2050	2050-2052	2052-2054	2054-2056	2056-2058	2058-2060	2060-2062	2062-2064	2064-2066	2066-2068	2068-2070	2070-2072	2072-2074	2074-2076	2076-2078	2078-2080	2080-2082	2082-2084	2084-2086	2086-2088	2088-2090	2090-2092	2092-2094	2094-2096	2096-2098	2098-2100	2100-2102	2102-2104	2104-2106	2106-2108	2108-2110	2110-2112	2112-2114	2114-2116	2116-2118	2118-2120	2120-2122	2122-2124	2124-2126	2126-2128	2128-2130	2130-2132	2132-2134	2134-2136	2136-2138	2138-2140	2140-2142	2142-2144	2144-2146	2146-2148	2148-2150	2150-2152	2152-2154	2154-2156	2156-2158	2158-2160	2160-2162	2162-2164	2164-2166	2166-2168	2168-2170	2170-2172	2172-2174	2174-2176	2176-2178	2178-2180	2180-2182	2182-2184	2184-2186	2186-2188	2188-2190	2190-2192	2192-2194	2194-2196	2196-2198	2198-2200	2200-2202	2202-2204	2204-2206	2206-2208	2208-2210	2210-2212	2212-2214	2214-2216	2216-2218	2218-2220	2220-2222	2222-2224	2224-2226	2226-2228	2228-2230	2230-2232	2232-2234	2234-2236	2236-2238	2238-2240	2240-2242	2242-2244	2244-2246	2246-2248	2248-2250	2250-2252	2252-2254	2254-2256	2256-2258	2258-2260	2260-2262	2262-2264	2264-2266	2266-2268	2268-2270	2270-2272	2272-2274	2274-2276	2276-2278	2278-2280	2280-2282	2282-2284	2284-2286	2286-2288	2288-2290	2290-2292	2292-2294	2294-2296	2296-2298	2298-2300	2300-2302	2302-2304	2304-2306	2306-2308	2308-2310	2310-2312	2312-2314	2314-2316	2316-2318	2318-2320	2320-2322	2322-2324	2324-2326	2326-2328	2328-2330	2330-2332	2332-2334	2334-2336	2336-2338	2338-2340	2340-2342	2342-2344	2344-2346	2346-2348	2348-2350	2350-2352	2352-2354	2354-2356	2356-2358	2358-2360	2360-2362	2362-2364	2364-2366	2366-2368	2368-2370	2370-2372	2372-2374	2374-2376	2376-2378	2378-2380	2380-2382	2382-2384	2384-2386	2386-2388	2388-2390	2390-2392	2392-2394	2394-2396	2396-2398	2398-2400	2400-2402	2402-2404	2404-2406	2406-2408	2408-2410	2410-2412	2412-2414	2414-2416	2416-2418	2418-2420	2420-2422	2422-2424	2424-2426	2426-2428	2428-2430	2430-2432	2432-2434	2434-2436	2436-2438	2438-2440	2440-2442	2442-2444	2444-2446	2446-2448	2448-2450	2450-2452	2452-2454	2454-2456	2456-2458	2458-2460	2460-2462	2462-2464	2464-2466	2466-2468	2468-2470	2470-2472	2472-2474	2474-2476	2476-2478	2478-2480	2480-2482	2482-2484	2484-2486	2486-
-----------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-------

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3677056

[Date of registration]

13.05.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]